

## РАЗДЕЛ II. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

---

### ОБРАЗОВАНИЕ S- НИТРОЗОТИОЛОВ - ДОНОРОВ NO – В УЛЬТРАЗВУКОВОМ ПОЛЕ

<sup>1</sup>Адамчук Р.И., <sup>1</sup>Степура И.И., <sup>2</sup>Кравчук Ю. В.

<sup>1</sup>*Институт биохимии НАН Беларуси, г. Гродно,*

<sup>2</sup>*Государственный медицинский университет, г. Гродно*

Как известно, оксид азота участвует в регуляции тонуса кровеносных сосудов, тормозит агрегацию тромбоцитов и их адгезию на стенках сосудов, функционирует в центральной и вегетативной нервных системах [1].

Оксид азота способен влиять на метаболические процессы как в самих клетках, так и расположенных по соседству. Это значит, что молекула NO, несмотря на свою высокую активность, способна транспортироваться на расстояния превышающие клеточные размеры по крайней мере в несколько раз. Очевидно, что этого можно достичь путем обратимого включения NO в соединения, способные переносить NO от клеток доноров к клеткам мишеням его действия. Кандидатами на роль таких переносчиков в настоящее время выступают S- нитрозотиолы.

S-нитрозотиолы, значительно более стабильные соединения при физиологических условиях. Время полупревращения, например, S-нитрозоглутатиона или S-нитрозоальбумина более 10 часов, а S-нитрозоцистеина более 90 мин., а для NO составляет примерно 5 сек. [2].

Как известно, ультразвук (УЗ) широко используется для диагностики в клинической медицине, в физиотерапии, а также в лабораторной практике для получения липосом, разрушения клеточных мембран. Действие ультразвука на организм обусловлено целым рядом факторов. Это в первую очередь механическое действие, тепловой эффект, а также химические реакции. Химические эффекты УЗ-ка связаны с образованием кавитационных пузырьков, в которых происходит диссоциация паров воды на OH и H радикалы [3].

Образовавшиеся первичные свободные радикалы взаимодействуют как между собой, так и с растворенными газами и образуют наряду с пероксидами водорода значительное количество оксидов азота, а также нитритов, нитратов. Сравнительно давно установлен факт усиления кровотока, вызванный местным расширением сосудов после воздействия УЗ-ка [4].

Это явление обусловлено не прогреванием мышечной ткани, так как при импульсном облучении, когда тепловые эффекты невелики, также изменяется кровоток. Причем изменения кровотока сохраняются около получаса после воздействия УЗ-ка на данный участок ткани или орган [5]. Также показано ускорение заживления хронических варикозных язв на ногах после воздействия УЗ-ка. Измеренное увеличение температуры было незначительным, что, вероятно, свидетельствует о нетепловом характере механизма воздействия [4]. Мы предполагаем, что в крови или отдельных органах могут образовываться S-нитрозосоединения при продолжительном воздействии УЗ-ка медицинского назначения. Принципиальная возможность возникновения кавитации в биологических тканях связана с неоднородностью среды, состоящей из клеток, внутритканевых жидкостей с различной насыщенностью кислородом и т. д. Глутатион основной внутриклеточный низкомолекулярный тиол, концентрация которого в клетках высока, например, в эритроцитах достигает 0.5-1.0 мМ.

В данной работе мы исследовали образование S-нитрозоглутатиона при воздействии ультразвука на водные растворы глутатиона и изменение агрегационных свойств тромбоцитов в присутствии S-нитрозоглутатиона.

#### *Материалы и методы исследования*

Водные растворы в атмосфере воздуха облучали ультразвуком с частотой 880 кГц и интенсивностью от 0.2 до 2 Вт/см<sup>2</sup>.

Образование S-нитрозоглутатиона после воздействия ультразвука на водные растворы глутатиона регистрировали спектрофотометрически [6]. Пероксиды водорода и пероксиды глутатиона измеряли йодометрическим методом с использованием каталазы. Выделение NO, наблюдаемое при распаде S-нитрозосоединений, контролировали по образованию нитрозоHb спектрофотометрическим, а также флуоресцентным методом по тушению пирена [6].

В исследованиях использовали донорскую кровь с 3.8 % трехзамещенным цитратом натрия в качестве антикоагулянта в соотношении с кровью 1:9. После центрифугирования (450 g, 10 мин), доводили уровень тромбоцитов  $2.5 \cdot 10^8$ /мл. Все подготовительные этапы проводили при 4°C. Степень агрегации оценивали на агрегометре производства ЗАО "СОЛАР" (Беларусь). В качестве индуктора агрегации применяли АДФ (Реанал) в концентрации 2.5 мкМ, что соответствовало 52 %-ной агрегации. Изучение влияния S-нитрозоглутатиона на тромбоцитарную гуанилатциклазу проводили в диапазоне конечных концентраций -  $5 \cdot 10^{-7}$  -  $5 \cdot 10^{-4}$  М. S-нитрозоглутатион добавляли к тромбоцитам за 3 мин (при 37°C) до внесения АДФ.

## СИНТЕЗ S-НИТРОЗОТИОЛОВ В УЛЬТРАЗВУКОВОМ ПОЛЕ

После воздействия УЗ-ка на водные растворы глутатиона в атмосфере воздуха наблюдали возникновение новой полосы в спектре поглощения с максимумом при 340 нм и более слабой полосы при 540 нм. Длинноволновая полоса поглощения ответственна за розовую окраску озвученных растворов глутатиона. Такой спектр поглощения характерен для S-нитрозотиолов [6].

Выход S-нитрозоглутатиона достигал максимального значения при концентрации GSH в растворе 8 мМ (табл. 1).

Таблица 1

**Образование S-нитрозоглутатиона под действием УЗ-ка на водные растворы глутатиона различной концентрации.**

**Время воздействия УЗ-ка 30 мин.**

Исходная концентрация глутатиона (мМ)	Значение оптической плотности (340 нм)	Концентрация S-нитрозоглутатиона (мМ)	Концентрация нитрита (мМ)	Доля глутатиона, превратившегося в S-нитрозоглутатион (%)
0	0	0	0,30	0
4,0	0,345	0,40	-	10
6,0	0,485	0,60	-	10
8,0	0,520	0,65	0,006	8,1
10,0	0,510	0,64	0,005	6,4

Наряду с образованием S-нитрозосоединений в УЗ-ом поле эффективно протекало окисление глутатиона в дисульфиды. После образования значительных количеств окисленного глутатиона (70% и более) наблюдали появление в растворе пероксидных соединений, титруемых йодометрическим методом. При дальнейшем воздействии УЗ-ка параллельно с возрастанием концентрации пероксидных соединений снижалось образование S-нитрозосоединений.

## ИЗМЕНЕНИЕ АГРЕГАЦИОННЫХ СВОЙСТВ ТРОМБОЦИТОВ В ПРИСУТСТВИИ S-НИТРОЗОГЛУТАТИОНА

Регуляция процессов агрегации и дезагрегации тромбоцитов млекопитающих осуществляется системой циклического гуанозинмонофосфата (цГМФ) через изменение активности гуанилатциклазы (ГЦ). Активаторы ГЦ, повышающие уровень цГМФ в тромбоцитах, проявляют антиагрегационное действие. Активирующее влияние некоторых лекарственных препаратов на основе органических нитратов, таких как, например, нитроглицерин обусловлено неферментативным освобождением из них оксида азота

Из полученных результатов следует, что S-нитрозоглутатион предотвращает агрегацию тромбоцитов в прямой зависимости от концентрации (табл. 2).

Таблица 2

**Изменение агрегационных свойств тромбоцитов под действием различных концентраций S-нитрозоглутатиона**

Концентрация S-нитрозоглутатиона (мМ)	Концентрация АДФ (мкМ)	Степень агрегации тромбоцитов %	Скорость агрегации тромбоцитов %
0	5	41,6 ± 7,5	52,0 ± 7,4
0,56	5	4,6 ± 3,7	12,2 ± 3,4
0,11	5	7,8 ± 5,1	8,4 ± 6,8
0,06	5	11,4 ± 2,5	-
0,005	2,5	13,8 ± 3,5	-
0,001	2,5	17,4 ± 2,6	-

Кроме того, при добавлении препарата на пике агрегации, наблюдалось увеличение скорости дезагрегационного процесса. Можно предположить, что эндогенный S-нитрозоглутатион, наряду с другими нитрозотиолами, может участвовать в регуляции агрегации тромбоцитов путем переноса NO на гем гуанилатциклазы и активации фермента.

Известно, что суспензия тромбоцитов весьма чувствительна к действию как низкочастотного, так и высокочастотного УЗ-ка. Показано, что УЗ *in vitro* инициирует агрегацию клеток и вызывает их повреждение. Однако *in vivo* в опытах на лабораторных животных не удалось обнаружить повреждения компонентов крови при облучении УЗ-ом. Напротив, при воздействии УЗ-ка усиливался кровоток и разрушались тромбы [4]. Мы предполагаем что благоприятный терапевтический эффект УЗ-ка на организм связан с образованием S-нитрозосоединений как низкомолекулярной природы так и S-нитрозобелков. S-нитрозосоединения являются донорами NO, который вызывает релаксацию сосудов и препятствует агрегации тромбоцитов.

*Литература*

1. Ванин А.Ф. (1998) Биохимия. – №63. – С.867-869.
2. Arnelle, D. R. and Stamler, J. S. // Arch. Biochem. Biophys. –1995. – V.318. – P.279-285
3. Riesz, P., and Kondo, T. Free Radical Biol. Med. –1992. – V.13. – P.247-270.
4. Haar, G. Physical Principles of Medical Ultrasonics (ed. K. Hill), Mir, Moscow. – 1989.
5. Dyson, M., Franks, C., and Suckling, J. Ultrasonics. – 1976. –V.14. – P.232-236.
6. Степура И. И., Адамчук Р. И., Пилетская Т. П., Степура В. И., Маскевич С. Н. // Биохимия. – 2000. - т.65. - С.1645-1658.